(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2011-217730
(P2011-217730A)
(43)公開日　平成23年11月4日(2011.11.4)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	ZNAC	4B024
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B064

審査請求 未請求　請求項の数 8　ＯＬ　（全 21 頁）

(21)出願番号　特願2010-254382 (P2010-254382)
(22)出願日　平成22年11月15日 (2010.11.15)
(31)優先権主張番号　特願2009-260998 (P2009-260998)
(32)優先日　平成21年11月16日 (2009.11.16)
(33)優先権主張国　日本国 (JP)
(31)優先権主張番号　特願2010-71233 (P2010-71233)
(32)優先日　平成22年3月26日 (2010.3.26)
(33)優先権主張国　日本国 (JP)

(71)出願人　302019245
タカラバイオ株式会社
滋賀県大津市瀬田三丁目４番１号
(72)発明者　松村　清之
滋賀県大津市瀬田三丁目４番１号　タカラバイオ株式会社内
(72)発明者　島田　敦
滋賀県大津市瀬田三丁目４番１号　タカラバイオ株式会社内
(72)発明者　松尾　佳菜子
滋賀県大津市瀬田三丁目４番１号　タカラバイオ株式会社内
(72)発明者　小代　俊浩
滋賀県大津市瀬田三丁目４番１号　タカラバイオ株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】タンパク質の製造方法

(57)【要約】
【課題】分泌発現において高純度のタンパク質を作製する方法、当該方法のための宿主ベクター系を提供すること。
【解決手段】配列特異的エンドリボヌクレアーゼの発現を制御し、使用する宿主が増殖している状態で、培養上清中の夾雑タンパク質を抑制し、目的タンパク質のアミノ酸配列を変化させることなく他の配列に置換されているＤＮＡ、あるいは目的タンパク質をコードするｍＲＮＡを過剰発現するＤＮＡのいずれかを宿主細胞に導入する工程を含む、前記目的タンパク質のみを取得できる方法。本発明を用いることにより、純度の高い目的のタンパク質をほとんど精製操作することなく取得することができる。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
タンパク質の製造方法であって、
（ａ）１）配列特異的エンドリボヌクレアーゼをコードするＤＮＡ、及び
２）シグナルペプチドとそれに連結された所望のタンパク質とからなる目的タンパク質をコードし、かつ配列特異的エンドリボヌクレアーゼ認識配列に対応する塩基配列の少なくとも１つが、前記目的タンパク質のアミノ酸配列を変化させることなく他の配列に置換されているＤＮＡ、を宿主細胞に導入する工程；及び
（ｂ）工程（ａ）で得られた宿主細胞を培養する工程；
を包含することを特徴とするタンパク質の製造方法。
【請求項２】
タンパク質の製造方法であって、
（ａ）１）配列特異的エンドリボヌクレアーゼをコードするＤＮＡ、及び
２）シグナルペプチドとそれに連結された所望のタンパク質とからなる目的タンパク質をコードし、かつ前記目的タンパク質をコードするｍＲＮＡを宿主細胞内で過剰発現するＤＮＡ、を宿主細胞に導入する工程；及び
（ｂ）工程（ａ）で得られた宿主細胞を培養する工程；
を包含することを特徴とするタンパク質の製造方法。
【請求項３】
宿主細胞が、細菌、酵母、真菌、担子菌、昆虫細胞、植物細胞、動物細胞から選択される細胞である請求項１又は２記載の方法。
【請求項４】
配列特異的エンドリボヌクレアーゼが２～７塩基の配列を認識してＲＮＡを切断するエンドリボヌクレアーゼである請求項１又は２記載の方法。
【請求項５】
配列特異的エンドリボヌクレアーゼがＭａｚＦ、ＰｅｍＫ、ＭｑｓＲから選択されるエンドリボヌクレアーゼである請求項４記載の方法。
【請求項６】
配列特異的エンドリボヌクレアーゼをコードするＤＮＡが宿主細胞の染色体に組み込まれる請求項１又は２記載の方法。
【請求項７】
タンパク質の製造に使用されるキットであって、
（１）遺伝子産物の分泌発現が可能な宿主；
（２）発現可能な形態で配列特異的エンドリボヌクレアーゼをコードするＤＮＡを含むベクター；及び
（３）プロモーター、シグナルペプチドをコードする配列及びマルチクローニングサイトを有するベクター；
を包含することを特徴とするキット。
【請求項８】
タンパク質の製造に使用されるキットであって、
（１）遺伝子産物の分泌発現が可能であり、かつ染色体に発現可能な形態で配列特異的エンドリボヌクレアーゼをコードするＤＮＡが組み込まれた宿主；及び
（２）プロモーター、シグナルペプチドをコードする配列及びマルチクローニングサイトを有するベクター；
を包含することを特徴とするキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、単一タンパク質分泌発現方法、当該方法のための宿主発現系、並びに当該方法を用いた目的タンパク質の簡便な製造方法に関する。

【背景技術】
【０００２】
ほとんどの細菌は、細胞ストレスに曝されると発現して、増殖停止及び最終的に死をもたらす自殺遺伝子を含有している。これらの毒素遺伝子は、通常、同じオペロン中の同族抗毒素遺伝子とともに同時発現されている（中毒モジュール又は抗毒素－毒素系と呼ぶ）。例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）は、５つの中毒モジュールを有し、その中で、ＭａｚＥ／ＭａｚＦモジュールが最も徹底的に調査されている。前記ＭａｚＥ／ＭａｚＦ複合体の立体構造は公知である。
【０００３】
ＭａｚＦは、一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）中の配列ＡＣＡを認識し、最初のＡの５’側において特異的に切断する、配列特異的エンドリボヌクレアーゼである。エンドヌクレアーゼは、核酸を核酸鎖内の様々な位置で切断する、酵素の大グループの１つである。エンドリボヌクレアーゼ又はリボヌクレアーゼは、ＲＮＡに特異的である。ＭａｚＦは、その主要な標的がインビボでのメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）であるので、ｍＲＮＡ干渉酵素と呼ばれる。転移ＲＮＡ（ｔＲＮＡ）及びリボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）は、それぞれ、その二次構造又はリボソームタンパク質との結合のせいで、切断から保護されているようである。したがって、ＭａｚＦが発現すると、ｍＲＮＡのみの特異的分解を引き起こし、タンパク質合成の激烈な減少、及び最終的には細胞死をもたらす。最近では、大腸菌タンパク質ＰｅｍＫ（プラスミドＲ１００によってコードされる）もまた、配列特異的エンドリボヌクレアーゼであることが示された。ＰｅｍＫは、ＵＡＸの配列を認識し、中央のＡの５’側又は３’側でＲＮＡを切断する。ここでＸはＣ、Ａ又はＵである。さらに最近では、同様のエンドリボヌクレアーゼとして、大腸菌タンパク質ＭｑｓＲが報告されている。ＭｑｓＲは、ＧＣＵのＧとＣの間でＲＮＡを切断する。
【０００４】
これらの配列特異的エンドリボヌクレアーゼはさまざまな種で保存されており、生理機能及び進化において必須の役割を果たしていることを強く示している。この配列特異的エンドリボヌクレアーゼ毒素のファミリーは、その主要な標的がインビボでのメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）であるので、「ｍＲＮＡ干渉酵素」とも呼ばれている。
【０００５】
また、特許文献１、非特許文献１には、ｍＲＮＡ干渉酵素を用いたタンパク質発現方法が開示されている。この方法は、宿主に導入する目的タンパク質をコードする遺伝子よりｍＲＮＡ干渉酵素の認識する塩基配列を除去したうえで、宿主中でｍＲＮＡ干渉酵素を発現させることを特徴としている。宿主由来のｍＲＮＡが、ｍＲＮＡ干渉酵素により分解されて翻訳が抑制されるため、宿主では目的タンパク質のみ発現されることとなる。特に同位体などで標識されたタンパク質の調製には威力を発揮すると言われている。しかしながら、ｍＲＮＡ干渉酵素の発現誘導以前に宿主に蓄積されているタンパク質と目的タンパク質とが共存するため、精製タンパク質の取得のためには従来通りの精製操作が必要である。また、前記方法ではｍＲＮＡ干渉酵素を発現させた後、宿主の増殖が抑制されるため、目的のタンパク質を大量に製造する用途には適していない。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００６】
【特許文献１】国際公開第２００４／１１３４９８号パンフレット
【非特許文献】
【０００７】
【非特許文献１】モレキュラー　セル（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｅｌｌ）、第１８巻、第２５３～２６１頁（２００５年）
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００８】

本発明の目的は、分泌発現において高純度のタンパク質を作製する方法、当該方法のための宿主ベクター系を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、配列特異的エンドリボヌクレアーゼの発現を制御し、使用する宿主が増殖している状態を維持させた状態で、培養上清中の夾雑タンパク質量を低減し、かつ目的タンパク質のみを取得できる方法を見出し、本発明を完成させた。

【００１０】

すなわち、本発明の第１の発明は、タンパク質の製造方法であって、

（ａ）１）配列特異的エンドリボヌクレアーゼをコードするＤＮＡ、及び

２）シグナルペプチドとそれに連結された所望のタンパク質とからなる目的タンパク質をコードし、かつ配列特異的エンドリボヌクレアーゼ認識配列に対応する塩基配列の少なくとも１つが、前記目的タンパク質のアミノ酸配列を変化させることなく他の配列に置換されているＤＮＡ、を宿主細胞に導入する工程；及び

（ｂ）工程（ａ）で得られた宿主細胞を培養する工程；

を包含することを特徴とするタンパク質の製造方法、に関する。

【００１１】

本発明の第２の発明は、タンパク質の製造方法であって、

（ａ）１）配列特異的エンドリボヌクレアーゼをコードするＤＮＡ、及び

２）シグナルペプチドとそれに連結された所望のタンパク質とからなる目的タンパク質をコードし、かつ前記目的タンパク質をコードするｍＲＮＡを宿主細胞内で過剰発現するＤＮＡ、を宿主細胞に導入する工程；及び

（ｂ）工程（ａ）で得られた宿主細胞を培養する工程；

を包含することを特徴とするタンパク質の製造方法、に関する。

【００１２】

第１、第２の発明において、宿主細胞としては細菌、酵母、真菌、担子菌、昆虫細胞、植物細胞、動物細胞から選択される細胞が例示される。

第１、第２の発明における配列特異的エンドリボヌクレアーゼとしては、２～７塩基の配列を認識してＲＮＡを切断するエンドリボヌクレアーゼが例示される。一つの態様として、配列特異的エンドリボヌクレアーゼはＭａｚＦ、ＰｅｍＫ、ＭｑｓＲから選択されるエンドリボヌクレアーゼである。さらに、配列特異的エンドリボヌクレアーゼをコードするＤＮＡが染色体に組み込まれた宿主細胞を使用する態様も本発明に包含される。

【００１３】

本発明の第３の発明は、タンパク質の製造に使用されるキットであって、

（１）遺伝子産物の分泌発現が可能な宿主；

（２）発現可能な形態で配列特異的エンドリボヌクレアーゼをコードするＤＮＡを含むベクター；及び

（３）プロモーター、シグナルペプチドをコードする配列及びマルチクローニングサイトを有するベクター；

を包含することを特徴とするキット、に関する。

【００１４】

本発明の第４の発明は、タンパク質の製造に使用されるキットであって、

（１）遺伝子産物の分泌発現が可能であり、かつ染色体に発現可能な形態で配列特異的エンドリボヌクレアーゼをコードするＤＮＡが組み込まれた宿主；及び

（２）プロモーター、シグナルペプチドをコードする配列及びマルチクローニングサイトを有するベクター；

を包含することを特徴とするキット、に関する。

前記の第３、第４の発明には、第１、第２の発明について示された宿主や配列特異的エンドリボヌクレアーゼを使用する態様が包含される。

【発明の効果】
【００１５】
本発明により、ほとんど精製の操作を行う（過程を経る）ことなく単一の目的タンパク質を取得することが可能となる。また、本発明の方法は、使用する宿主に枯草菌を用いた場合、エンドトキシンフリーの高純度目的タンパク質を取得できるという点で有用である。
【図面の簡単な説明】
【００１６】
【図１】本システムで分泌発現させた培養上清のＳＤＳ－ＰＡＧＥの結果を示す図である。
【図２】本システムで分泌発現させた培養上清のＳＤＳ－ＰＡＧＥの結果を示す図である。
【図３】本システムで分泌発現させたタンパク質の酵素活性を示すグラフである。
【図４】本システムで分泌発現させた酵素の比活性を示すグラフである。
【発明を実施するための形態】
【００１７】
本明細書において「配列特異的エンドリボヌクレアーゼ」とは、一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）を特定の塩基配列において特異的に切断する、エンドリボヌクレアーゼのことを言う。また、当該酵素は、ＲＮＡに特異的であり、生体内でのその主要な標的はメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）である。前記の「ｍＲＮＡ干渉酵素」も「配列特異的エンドリボヌクレアーゼ」に包含される。
【００１８】
本発明に使用される配列特異的エンドリボヌクレアーゼは、前記の活性を有するものであれば、天然において存在するものと同一のアミノ酸配列の酵素には限定されるものではない。当該酵素の変異体、誘導体も前記配列特異的エンドリボヌクレアーゼに包含される。変異体としては、配列特異的エンドリボヌクレアーゼのアミノ酸配列に１つ又は数個のアミノ酸の挿入、付加、欠失又は置換が生じたアミノ酸配列のポリペプチドが例示される。例えば、天然のアミノ酸配列と９０％以上、好ましくは９５％以上、さらに好ましくは９８％以上のアミノ酸配列上の配列同一性を有する変異体を本発明に使用することができる。また、誘導体としては、例えば配列特異的エンドリボヌクレアーゼに異種のペプチドやポリペプチドを付加したものが例示される。このような誘導体には、宿主内での半減期を延長した誘導体や、細胞内での局在を改変した誘導体が包含される。
【００１９】
本明細書において、「遺伝子もしくは核酸の導入」、並びに「形質転換」とは、遺伝子や核酸が細胞内に導入されることを意味する。前記の遺伝子もしくは核酸は、染色体、プラスミド、プラスチド又はミトコンドリアＤＮＡに組み込また状態で細胞に保持されるか、もしくは一過性に保持された後、消失し得る。
【００２０】
（１）本発明のタンパク質分泌発現方法
本発明のタンパク質分泌発現方法に使用される宿主には限定はなく、タンパク質を分泌発現可能な宿主であれば使用することができる。例えば、細菌、酵母、真菌、担子菌、昆虫細胞、植物細胞、動物細胞等を使用できる。好適には、枯草菌及びその近縁の細菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ属細菌、Ｂｒｅｖｉｂａｃｉｌｌｕｓ属細菌等）が宿主として使用される。また、酵母としては、Ｐｉｃｈｉａ属、Ｃａｎｄｉｄａ属、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ属、Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ属、Ｈａｎｓｅｎｕｌａ属等が宿主として使用できる。さらに、培養細胞としては、ＣＨＯ細胞、ＨＥＫ２９３細胞、Ｈｅｌａ細胞、ＭＤＣＫ細胞、ＮＩＨ３Ｔ３細胞、ＰＣ１２細胞、Ｓ２細胞、Ｓｆ９細胞、Ｖｅｒｏ細胞、あるいはＢＹ－２細胞等が宿主として使用できる。
【００２１】
本発明の方法においては、所望のタンパク質をコードするｍＲＮＡ以外のｍＲＮＡから

の翻訳を抑制することにより、所望のタンパク質の特異的な生産が実施される。ｍＲＮＡからの翻訳は、配列特異的エンドリボヌクレアーゼによって抑制することが可能である。例えば、２塩基以上の配列、好ましくは３塩基以上の配列を認識して切断するエンドリボヌクレアーゼが本発明に使用される。また、前記認識配列は、好ましくは７塩基以下の配列、さらに好ましくは５塩基以下の配列である。さらに、使用する宿主のｒＲＮＡやｔＲＮＡに対する活性が低い、もしくはこれらＲＮＡを切断しない配列特異的エンドリボヌクレアーゼが本発明には特に好ましい。さらに例えば、大腸菌由来のＭａｚＦ、ＰｅｍＫ、ＭｑｓＲ、国際公開第２００６／１２３５３７号パンフレット記載のエンドリボヌクレアーゼ、国際公開第２００７／１３２６４号パンフレット記載のエンドリボヌクレアーゼ、国際公開第２００７／１３２６５号パンフレット記載のエンドリボヌクレアーゼ、国際公開第２００７／１０７４０号パンフレット記載のエンドリボヌクレアーゼ、並びに国際公開第２００７／３４６９３号パンフレット記載のエンドリボヌクレアーゼ等が本発明に使用できる配列特異的エンドリボヌクレアーゼとして挙げられる。

【００２２】

本発明の方法においては、当該配列特異的エンドリボヌクレアーゼをコードする遺伝子を使用する宿主中で保持できるベクターを用いて発現させることができる。特に限定はされないが、ＣｏｌＥ１　ｏｒｉを利用したｐＵＣなどの大腸菌用ベクター、２μオリジンを利用した酵母用ベクター等の多コピーベクター、Ｆ　ｐｌａｓｍｉｄの改変ベクターやＣＥＮを利用した酵母用ベクター等の１コピーベクター、あるいはλファージ、バキュロウィルス、アデノウィルスもしくはレトロウィルス由来のファージ／ウィルスベクターなどが例示される。好ましくは、配列特異的エンドリボヌクレアーゼをコードする遺伝子は相同組換えやその他の方法を利用して、使用する宿主の染色体に組み込むことができる。過剰量の配列特異的エンドリボヌクレアーゼの発現を起こさない点で、宿主が多コピーの配列特異的エンドリボヌクレアーゼ遺伝子を保持することのない、染色体への組み込みが本発明には好ましい。染色体への組み込み方法として、直接ＤＮＡ断片を導入する手法の他、トランスポゾンやファージ／ウィルスベクターなどを利用したランダムな遺伝子導入、相同組換えを利用した部位特異的な遺伝子導入法が好適に使用できる。

【００２３】

本発明の方法において、使用する宿主内で配列特異的エンドリボヌクレアーゼを発現させる必要がある。その一方で、当該配列特異的エンドリボヌクレアーゼによる使用宿主の増殖抑制は、好ましいものではなく、むしろ増殖を維持した状態になることが好ましい。さらに好ましくは、増殖は維持されているが、本来分泌発現されているタンパク質の発現が抑制されている状態が好ましい。

【００２４】

上記状態を確認する方法としては、使用する宿主の増殖曲線を参考にする方法が例示される。また、宿主内の遺伝子あるいは発現タンパク質をマーカーとして宿主の状態を確認してもよい。例えば、増殖曲線を用いる場合、当該曲線の傾きが当該配列特異的エンドリボヌクレアーゼをコードする遺伝子を導入していない場合と同じか若干低い状態の宿主が本発明に好ましい。なお、目的タンパク質の分泌発現の状態に応じて配列特異的エンドリボヌクレアーゼの発現度合いを最適化するのは当業者として当然のことである。

【００２５】

配列特異的エンドリボヌクレアーゼ発現の制御方法としては、配列特異的エンドリボヌクレアーゼをコードする遺伝子のコピー数の制御、プロモーターの選択、使用されるプロモーターに適した誘導物質、例えばＩＰＴＧ、アラビノース、１級アルコールやテトラサイクリンの添加、温度感受性配列特異的エンドリボヌクレアーゼ（もしくは対応するアンチトキシンタンパク質の温度感受性変異体）や温度感受性制御因子を利用した温度変化による制御、又は相同組換え促進因子の導入による発現システムの変更が好適に使用できる。さらに当該配列特異的エンドリボヌクレアーゼに対するアンチトキシンタンパク質をコードする遺伝子を共発現させて制御させてもよい。本発明を特に限定するものではないが、下記実施例に記載のとおり、枯草菌を宿主とする場合には、配列特異的エンドリボヌク

レアーゼをコードする遺伝子を染色体上に組み込んでコピー数を制限することで良好な結果が得られる。

【００２６】

本発明の方法により発現されるタンパク質には限定はない。例えば、酵素、構造タンパク質、サイトカイン類、抗体、蛍光タンパク質等に本発明の方法を使用することができる。前記タンパク質は天然のアミノ酸配列のタンパク質のみに限定されるものではなく、変異体、誘導体や複数のタンパク質の融合タンパク質であってもよい。

本発明の方法は所望のタンパク質を宿主細胞外に分泌させることを特徴とする。このため、前記タンパク質をコードする遺伝子は、分泌発現のためのシグナルペプチドがＮ末端に連結されたタンパク質をコードする遺伝子として作製される。所望のタンパク質がシグナルペプチドを有しないものである場合、異種のタンパク質由来のシグナルペプチドが連結される。

【００２７】

本発明の方法においては、シグナルペプチドに連結された所望のタンパク質（以下、目的タンパク質と記載する）をコードする遺伝子は、転写されるｍＲＮＡが配列特異的エンドリボヌクレアーゼの作用に対して耐性を持つように作製される。特に限定はされないが、例えば、転写により生成するｍＲＮＡ中の配列特異的エンドリボヌクレアーゼ認識配列を少なくとも１つ減少させることにより、当該ｍＲＮＡの配列特異的エンドリボヌクレアーゼに対する感受性を低下させることができる。ｍＲＮＡ中の配列特異的エンドリボヌクレアーゼ認識配列の該当箇所は、目的タンパク質のｍＲＮＡをコードするＤＮＡの塩基配列を改変することによって減少させることができる。この際、シグナルペプチド並びに所望のタンパク質のアミノ酸配列は変化させない、もしくは許容される程度の変化とすることが好ましい。目的タンパク質のｍＲＮＡをコードするＤＮＡ中の配列特異的エンドリボヌクレアーゼの認識配列は、好ましくは３以下、より好ましくは１以下であり、さらに前記配列を有さないＤＮＡが特に好ましい。前記の塩基配列の改変は、例えば、遺伝子の人工的合成や公知の部位特異的変異導入方法により実施することができる。さらに、目的のタンパク質をコードするｍＲＮＡを他の夾雑ｍＲＮＡよりも大過剰に発現させることにより、実質的に目的タンパク質をコードするｍＲＮＡを他に優先して残存させることによっても行うことができる。目的タンパク質のｍＲＮＡを過剰発現させる方法としては、強力なプロモーターや、使用されるプロモーターに適した強力な発現誘導物質の使用などが挙げられる。

【００２８】

本発明において、目的タンパク質には精製のためのタグ配列（Ｈｉｓ　Ｔａｇ、Ｆｌａｇ　Ｔａｇ等）を付加することができる。例えば、目的タンパク質のｍＲＮＡをコードするＤＮＡにタグ配列をコードするＤＮＡを付加することにより、タグ配列を有する目的タンパク質が分泌発現される。

【００２９】

本発明の方法において、目的タンパク質をコードする遺伝子は、配列特異的エンドリボヌクレアーゼをコードする遺伝子と同様に、適切なベクターにより宿主に導入されるか、もしくは宿主染色体に組み込まれる。目的タンパク質を高発現させるためには使用する宿主で十分なｍＲＮＡを転写できるような導入手段を選択することが好ましい。特に限定はされないが、宿主で多コピーの維持が可能なベクターを使用する、染色体上の強力なプロモーター下流に目的遺伝子を組み込むなどの手段が好適に使用される。特に限定はされないが、大腸菌とのシャトルベクターが好ましい。あるいは、コピー数が高いものであれば宿主専用ベクターであってもよい。宿主が枯草菌である場合には、ｐＵＢ１１０　ｏｒｉを有する枯草菌の発現ベクターが例示される。なお、本発明の方法では、複数の目的タンパク質をコードする遺伝子を導入して、宿主に複数のタンパク質を分泌発現させることも可能である。

【００３０】

さらに当該ベクターにおいては、使用宿主や所望のタンパク質に応じて最適なプロモー

ター及び分泌シグナルペプチドを選択することは当然のことである。
例えば使用宿主が枯草菌の場合、プロモーターとしてはズブチリシンプロモーター、ＳｐｏＶＧプロモーター等を使用することができる。枯草菌分泌シグナルペプチドとしては、例えばジャーナル オブ モレキュラー バイオロジー（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．）、第３６２巻、第３９３～４０２頁（２００６年）に記載されたシグナルペプチドを使用することができる。即ち、本発明の方法においては、上記文献記載の１７３種類の分泌シグナルペプチドＤＮＡライブラリーを用いて所望のタンパク質の分泌発現に好適なシグナルペプチドをスクリーニングすることができる。
さらに、ターミネーター、ポリＡシグナル、エンハンサーやイントロン等を発現ベクターに挿入してもよい。

【００３１】
本発明の方法において配列特異的エンドリボヌクレアーゼ遺伝子を導入した宿主、当該配列特異的エンドリボヌクレアーゼに耐性を有する目的タンパク質をコードするｍＲＮＡを組み合わせることにより、当該目的タンパク質をコードするｍＲＮＡ以外の他の夾雑タンパク質のｍＲＮＡは分解される。あるいは、当該目的タンパク質をコードするｍＲＮＡを他の夾雑タンパク質のｍＲＮＡよりも大量に発現させることによっても、上記配列特異的エンドリボヌクレアーゼに実質的に耐性な状態に等しくすることができる。その結果、目的タンパク質の合成量並びに分泌量が増加するため、培養上清中に所望のタンパク質のみが選択的に分泌発現されているものと推測される。しかしながら、本発明の方法においては、使用宿主の増殖を維持した状態で、ｍＲＮＡ分解酵素の発現を行う全ての手段が含まれる。また、目的タンパク質の発現についても上記宿主の条件下で目的タンパク質以外の分泌タンパク質の発現を抑制し、目的タンパク質のみ選択的に発現させる全ての方法が含まれる。

【００３２】
本発明の方法において、目的タンパク質遺伝子並びに配列特異的エンドリボヌクレアーゼ遺伝子を保持する宿主の培養時間は、使用する宿主ごとに適宜設定し、また、最適化することができる。例えば枯草菌の場合は、好ましくは１０時間以上、さらに好ましくは２０時間以上、特に好ましくは２８時間以上である。一般的に培養時間を長くすると宿主が溶解することがあるが、溶解に関与する遺伝子を破壊した宿主を用いることにより、所望のタンパク質の発現を長期にわたり継続させることができる。特に限定はされないが、例えばｃｗｌＣ、ｃｗｌＨあるいはｌｙｔＣ遺伝子を破壊した枯草菌が好適に使用できる。
培養温度も、使用する宿主ごとに最適化することができる。例えば枯草菌の場合は、好ましくは２０℃以上、さらに好ましくは２８℃以上である。通常、４０℃以上での培養は行われず、好適な培養温度は３７℃以下である。

【００３３】
本発明の方法に使用される培地にも限定はなく、宿主に適したものを適宜選択すればよい。目的タンパク質をより高い純度で取得するためには、最少培地のような低分子ペプチドが含まれない、あるいは微量であるような培地を用いることができる。特に限定はされないが、例えば枯草菌の場合、ＬＢ培地をプロテアーゼ処理した培地、あるいはＳｐｉｚｅｎの最少合成培地に各種アミノ酸、ビタミン、希少金属を加えた培地が例示される。

【００３４】
本発明の方法は、下記のような遺伝子発現システムを構築して実施することができる。
［１］以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）を含むシステム。
（ａ）形質転換が可能であって、遺伝子産物の分泌発現が可能な宿主；
（ｂ）発現可能な形態で配列特異的エンドリボヌクレアーゼをコードするＤＮＡを含む第１のベクター；及び
（ｃ）発現可能な形態で目的タンパク質をコードするＤＮＡを含む第２のベクター、ここで目的タンパク質をコードする単離されたＤＮＡは、少なくとも１つの配列特異的エンドリボヌクレアーゼ認識配列がコードされるアミノ酸配列を変化させることなく他の配列に

置換されているものである。
（ａ）の宿主は、（ｂ）及び（ｃ）のベクターで形質転換され、目的タンパク質を特異的に分泌発現する能力を獲得する。
【００３５】
［２］以下の（ａ）、（ｂ）を含むシステム
（ａ）遺伝子産物の分泌発現が可能な宿主、ここで、当該宿主の染色体には、配列特異的エンドリボヌクレアーゼをコードするＤＮＡが発現可能な形態で組み込まれており；及び
（ｂ）発現可能な形態で目的タンパク質をコードするＤＮＡを含むベクター、ここで目的タンパク質をコードするＤＮＡは、少なくとも１つの配列特異的エンドリボヌクレアーゼ認識配列がコードされるアミノ酸配列を変化させることなく他の配列に置換されている。
（ａ）の宿主は（ｂ）のベクターで形質転換され、目的タンパク質を特異的に分泌発現する能力を獲得する。
【００３６】
［３］以下の目的タンパク質を特異的に分泌発現する能力を獲得した宿主からなるシステム
遺伝子産物の分泌発現が可能な宿主、ここで、当該宿主の染色体には、配列特異的エンドリボヌクレアーゼをコードするＤＮＡ、並びに目的タンパク質をコードするＤＮＡが発現可能な形態で組み込まれており、かつ目的タンパク質をコードするＤＮＡは、少なくとも１つの配列特異的エンドリボヌクレアーゼ認識配列がコードされるアミノ酸配列を変化させることなく他の配列に置換されている。
【００３７】
［４］以下の（ａ）、（ｂ）を含むシステム
（ａ）遺伝子産物の分泌発現が可能な宿主、ここで、当該宿主の染色体には、配列特異的エンドリボヌクレアーゼをコードするＤＮＡが発現可能な形態で組み込まれており；
（ｂ）発現可能な形態で目的タンパク質をコードするＤＮＡを含むベクター、ここで、当該ベクターは目的タンパク質をコードするｍＲＮＡを宿主内で過剰発現する能力を有している。
（ａ）の宿主は、（ｂ）のベクターで形質転換され目的タンパク質を特異的に分泌発現する能力を獲得する。
以上のシステムにおいて「発現可能な形態」とは、対象のＤＮＡがプロモーターの下流の適切な位置に配置されており、宿主内で当該ＤＮＡよりｍＲＮＡの転写が起こり得る状態であることを意味する。
【００３８】
以上の、各システムによる本発明の実施は、本明細書の開示、並びに周知の遺伝子工学的手法に基づいて、宿主細胞や各種ベクターの調製、遺伝子導入、細胞の培養等の諸操作を行うことにより、当業者には容易になし得る。
【００３９】
本発明の方法により、目的のタンパク質のみを選択的に分泌発現させることができる。本発明の方法で宿主の培地中に分泌されるタンパク質は非常に純度が高いため、例えば、生物活性の測定を精製操作なしに実施することができる。また、タグ配列などを付加することなく発現させた場合であっても、容易に高純度のタンパク質を取得できるため、天然のアミノ酸配列を保持したタンパク質の製造に特に有用である。
【００４０】
（２）本発明の方法のためのキット
本発明のタンパク質発現方法に使用される宿主、ベクターをキットとすることにより、本発明を容易に実施することが可能となる。例えば、前記の「遺伝子発現システム」を構成するメンバーを組み合わせたキットが本発明に好適である。
【００４１】
当該キットに含まれる宿主は、前述の通り、遺伝子産物の分泌発現が可能な宿主であれば、特に限定はない。例えば、細菌、酵母、真菌、担子菌、昆虫、植物、動物のいずれで

あってもよいが、取扱いの容易さ等の観点からは枯草菌が好適である。例えば、発現可能な形態で配列特異的エンドリボヌクレアーゼをコードするＤＮＡを含むベクターで形質転換された宿主、染色体に配列特異的エンドリボヌクレアーゼをコードするＤＮＡが発現可能な形態で組み込まれた宿主、であってもよい。前者の場合には、形質転換されていない宿主とベクターとを組み合わせて提供してもよい。

【００４２】

本発明のキットには、所望のタンパク質の発現に利用可能なベクターが含まれる。当該ベクターは宿主に応じて適切なものを選択すればよく、ファージ、プラスミド、コスミド、バクミド、ファージ又はウイルスのいずれもが好適に使用できる。前記機能を有するＤＮＡ断片であってもよい。これらのベクターは、好適には、プロモーターや転写制御に係る各種の調節因子（ターミネーター、ポリＡシグナル、エンハンサー、イントロン等）と、適切な位置に所望のタンパク質をコードするＤＮＡを挿入するためのマルチクローニングサイトを有している。さらに、宿主で機能するシグナルペプチドをコードする配列を有していてもよい。前記の調節因子、マルチクローニングサイト、シグナルペプチドをコードする配列は所望のタンパク質の発現に適した位置に配置されるべきである。

【００４３】

（３）本発明を利用した変異生理活性タンパク質のスクリーニング方法

本発明の方法で得られるタンパク質は純度が高いため、ほとんど精製操作をすることなく種々のアッセイに用いることができる。このことから、変異を導入したタンパク質を本発明の方法を利用して分泌発現させることにより、その変異タンパク質の表現型について簡単に確認し、また、望まれる変異体を迅速にスクリーニングすることができる。

本発明を特に限定するものではないが、例えば、目的タンパク質をコードするＤＮＡに変異を導入することによりスクリーニングするための候補変異タンパク質遺伝子を調製する。前記の変異は、無作為に、もしくは特定の塩基又は領域に導入することができる。次に当該変異体遺伝子について、前記の本発明のタンパク質分泌発現方法を用いて、変異タンパク質を分泌発現させる。宿主培養液の上清そのもの、もしくはここから簡易精製した試料について適当なアッセイを行うことにより、当該変異タンパク質の生理活性の確認、所望の変異体の選抜を行うことができる。またタンパク質の分泌発現方法も極めて簡便であるため、例えば９６ｗｅｌｌの培養機器などを用いることで、数多くの変異体タンパク質を一度に取り扱うことが可能であり、自動化したアッセイシステムに容易に取り込むことができる。このため変異導入薬剤、ＰＣＲなどによりランダムに変異を導入した生理活性タンパク質に対しても、タンパク質レベルでの機能評価が容易に可能である。

【実施例】

【００４４】

以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。

また、本明細書に記載の操作のうち、プラスミドの調製、制限酵素消化などの基本的な操作については２００１年、コールド　スプリング　ハーバー　ラボラトリー発行、Ｊ．サムブルック（Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋ）ら編集、モレキュラー　クローニング：ア　ラボラトリー　マニュアル第３版（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　：　Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ　３ｒｄ　ｅｄ．）に記載の方法によった。

【００４５】

実施例１　ｍａｚＦ誘導発現系導入プラスミドの作製

（１）薬剤耐性因子ｔｅｔの導入

枯草菌ゲノムにｍａｚＦ誘導発現系を導入するためのプラスミドは、以下のように作製した。最初に、ＳＰＰ　Ｓｙｓｔｅｍ　Ｉ（タカラバイオ社製）中の大腸菌のｍａｚＦ発現誘導ベクターであるｐＭａｚＦ　ＤＮＡに対し、枯草菌で働くことのできる薬剤耐性因子ｔｅｔを導入した。当該ｔｅｔ遺伝子は、ｐＨＹ３００ＰＬＫ　ＤＮＡ（タカラバイオ社製）を鋳型とし、配列表の配列番号１及び２記載の塩基配列を有するプライマーｔｅｔ１及びｔｅｔ２を用いたＰＣＲにより増幅した。

【００４６】
ＰＣＲは、以下のように行った。即ち、鋳型ＤＮＡとしてｐＨＹ３００ＰＬＫ プラスミドＤＮＡ ０．１ｐｇ、前記の２種の合成プライマー各１０ｐｍｏｌを含む５０μＬのＰＣＲ反応液を、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ（登録商標） ＨＳ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（タカラバイオ社製）を使用し、当該商品の説明書に従って調製した。前記反応液をＴａＫａＲａ ＰＣＲ Ｔｈｅｒｍａｌ Ｃｙｃｌｅｒ ＳＰ（タカラバイオ社製）にセットし、９８℃ １分反応後、９８℃ １０秒、５５℃ １５秒、７２℃ ２分を１サイクルとする３０サイクルの反応を行なった。
【００４７】
反応終了後、反応液より精製したＤＮＡをＢａｍＨＩ、ＨｉｎｄＩＩＩ（ともにタカラバイオ社製）の２種の制限酵素で切断して得られる１．５ｋｂｐのＤＮＡ断片を調製した。この断片はＢａｍＨＩ、ＨｉｎｄＩＩＩの突出末端を持つ、ｔｅｔ遺伝子を含むＤＮＡ断片である。得られたＤＮＡ断片の塩基配列を配列表の配列番号３に示す。
【００４８】
同様に、プラスミドｐＭａｚＦ ＤＮＡをＢａｍＨＩ、ＨｉｎｄＩＩＩで切断して４．８ｋｂｐのＤＮＡ断片を調製した。このＤＮＡ断片と前述のｔｅｔ遺伝子を含むＤＮＡ断片を混合後、ＤＮＡ Ｌｉｇａｔｉｏｎ Ｋｉｔ ＜Ｍｉｇｈｔｙ Ｍｉｘ＞（タカラバイオ社製）を用いて１６℃ ３０分間のライゲーション反応を実施した。反応終了後、反応液の一部を用いて大腸菌ＪＭ１０９株（タカラバイオ社製）を形質転換し、クロラムフェニコール耐性のコロニーを選択した。さらに、得られたコロニーのうちからｐＭａｚＦにｔｅｔ遺伝子が導入されたプラスミドを含むものを選択した。こうして得られたプラスミドを「ｐＭａｚＦ ｔｅｔ」と命名した。
【００４９】
（２）プロモーターの変換
次にｐＭａｚＦ ｔｅｔのｌａｃＩ発現用のプロモーターを枯草菌の構成的プロモーターであるｖｅｇプロモーターに変換した。まず、Ｇｅｎｂａｎｋ Ａｃｃ．ＮＣ＿０００９６４で公開されている枯草菌ｖｅｇ遺伝子の塩基配列、タカラバイオ社ＨＰで公開されているｌａｃＩ遺伝子の塩基配列に基づき、それぞれ配列表の配列番号４、５、６及び７記載の塩基配列を有するプライマーｖｅｇ３、ｖｅｇ／ｌａｃ４、ｌａｃ５及びｌａｃ６を合成した。上記プライマーｖｅｇ３は、ｖｅｇプロモーターの上流の塩基配列（核酸番号１７－３４）に加えて制限酵素ＢｇｌＩＩ（核酸番号１１－１６）の認識配列を有している。プライマーｖｅｇ／ｌａｃ４は、ｖｅｇプロモーターの下流の塩基配列に相補的な配列（核酸番号１６－３１）に加えてｌａｃＩ遺伝子の１－５番目のアミノ酸をコードする塩基配列（ただし１、２番目アミノ酸をコードするＧＴＧＡＡＡをＡＴＧＧＴＡに変換）に相補的な塩基配列（核酸番号１－１４）を有している。プライマーｌａｃ５は、上記ｌａｃＩの１、２番のアミノ酸をコードする変異塩基配列ＡＴＧＧＴＡ（核酸番号１－６）に加えて、ｌａｃＩの３－９番目のアミノ酸をコードする塩基配列（核酸番号７－２５）を有している。プライマーｌａｃ６は、ｌａｃＩの１０７－１１６番目のアミノ酸をコードする塩基配列に相補的な塩基配列（核酸番号１－２７）を有している。
【００５０】
ＰＣＲは、以下の条件で行った。即ち、ｖｅｇプロモーターＤＮＡ断片の場合、鋳型ＤＮＡとして常法で調製されたＢａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ ゲノムＤＮＡ １０ｎｇ、各１０ｐｍｏｌの上記プライマーｖｅｇ３及びｖｅｇ／ｌａｃ４を含む５０μＬのＰＣＲ反応液を、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ ＨＳ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅを使用して調製した。前記反応液をＴａＫａＲａ ＰＣＲ Ｔｈｅｒｍａｌ Ｃｙｃｌｅｒ ＳＰにセットし、９８℃ １分反応後、９８℃ １０秒、５５℃ １５秒、７２℃ １分を１サイクルとする３０サイクルの反応を行なった。
【００５１】
また、鋳型をｐＭａｚＦプラスミドＤＮＡ（１００ｐｇ）、プライマーをｌａｃ５及びｌａｃ６に変更した同様のＰＣＲ反応液を調製して同じ条件で反応を行い、ｌａｃＩ Ｄ

ＮＡ断片を増幅した。さらに、前記のそれぞれの反応後の反応液１μＬずつを混合した混合液を鋳型とし、プライマーｖｅｇ３及びｌａｃ６を各１０ｐｍｏｌずつ含む５０μＬのＰＣＲ反応液をＰｒｉｍｅＳＴＡＲ　ＨＳ　ＤＮＡ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅを用いて調製した。この反応液を前記２回のＰＣＲと同様の反応条件で反応させた。この反応液より約０．８ｋｂのＤＮＡバンドを精製し、ｖｅｇプロモーターにｌａｃＩプロモーターのＮ末端領域が接続されたＤＮＡ断片を得た。一方、ｐＭａｚＦ　ｔｅｔ　ＤＮＡを制限酵素ＢｇｌＩＩ（タカラバイオ社製）、ＡｐａＬＩ（タカラバイオ社製）で切断して約５．６ｋｂｐのＤＮＡ断片を得た。この２つのＤＮＡ断片を混合し、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（商標）Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ（タカラバイオ社製）で連結した。この反応液を用いて大腸菌ＪＭ１０９株を形質転換し、クロラムフェニコール耐性を指標として選択することにより、ｐＭａｚＦ　ｔｅｔのｌａｃＩプロモーターをｖｅｇプロモーターに変換したプラスミドを得た。このプラスミドを「ｐＭａｚＦ　ｖｅｇ　ｔｅｔ」と命名した。

【００５２】

（３）ＩＰＴＧ誘導プロモーターへの変換

さらにｍａｚＦ発現用のプロモーターを枯草菌でのＩＰＴＧ誘導可能なプロモーターに変換した。まず、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｐｒ　Ｐｕｒｉｆ．２００６　４６（２）：１８９－１９５に記載されているｇｒａｃプロモーターの塩基配列を参考に、ｌａｃオペレーターをもう一つと枯草菌でのカタボライト抑制因子ｃｃｐＡの認識配列を追加した人工プロモーターを考案した。次に、配列表の配列番号８、９、１０、１１、１２及び１３記載の塩基配列を有するプライマーｇｌａｃ７、ｇｌａｃ８、ｇｌａｃ９、ｇｌａｃ１０、ｇｌａｃ１１、ｇｌａｃ１２を合成した。

【００５３】

まず、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓゲノムＤＮＡ　１００ｎｇ、１０ｐｍｏｌのプライマーｇｌａｃ８及びｇｌａｃ９を用いる以外は、上記実施例１－（２）と同じ組成の反応液を調製し、上記実施例１－（２）記載の条件でＰＣＲを行った。このＰＣＲにより、９１ｂｐのＤＮＡ断片を増幅した。次に、このＰＣＲによる増幅ＤＮＡ断片を鋳型とし、プライマーｇｌａｃ７及びｇｌａｃ１０を用いたＰＣＲ、その増幅産物を鋳型としてプライマーｇｌａｃ７及びｇｌａｃ１１を用いたＰＣＲ、さらにその増幅断片を鋳型としてプライマーｇｌａｃ７及びｇｌａｃ１２を用いたＰＣＲを、順次行い、最終的に１５８ｂｐのＤＮＡ断片を増幅した。この断片をｇｌａｃ－ｃプロモーター断片と命名し、その塩基配列を配列表の配列番号１４に示す。

【００５４】

上記ｇｌａｃ－ｃプロモーターＤＮＡ断片を制限酵素ＢｇｌＩＩ及びＮｄｅＩ（ともにタカラバイオ社製）で切断し、約０．１５ｋｂｐのＤＮＡ断片を調製した。また、同様の操作をｐＭａｚＦ　ｖｅｇ　ｔｅｔプラスミドについても行い、約６．３ｋｂのＤＮＡ断片を調製した。これらの断片を混合し、ＤＮＡ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ　＜Ｍｉｇｈｔｙ　Ｍｉｘ＞を用いて１６℃で３０分間ライゲーションした。反応終了後、反応液を用いて大腸菌ＪＭ１０９株を形質転換し、クロラムフェニコール耐性菌株を分離した。このクロラムフェニコール耐性菌株からｐＭａｚＦ　ｖｅｇ　ｔｅｔプラスミドのｍａｚＦプロモーターがｌａｃからｇｌａｃ－ｃに変換したプラスミドを得た。このプラスミドを「ｐＮ　ｖｅｇ　ｇｌａｃ－ｃ」と命名した。

【００５５】

実施例２　ｍａｚＦ誘導発現枯草菌の構築

（１）ｍａｚＦ誘導発現系導入枯草菌ＮｖｃＦ株の作製

実施例１－（３）で構築されたｐＮ　ｖｅｇ　ｇｌａｃ－ｃプラスミドを用いて、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ　Ｓｅｃｒｅｔｏｒｙ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ（タカラバイオ社製）中の枯草菌ＲＩＫ１２８５株（タカラバイオ社製）の形質転換を行った。形質転換の方法はＢ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ　Ｓｅｃｒｅｔｏｒｙ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ添付の取扱説明書に準じて行った。１

０μｇ／ｍＬのテトラサイクリンを含む１．５％　ＬＢ－アガロースの寒天培地上で３７℃一晩培養して出現したテトラサイクリン耐性株を分離した。さらに、得られた株について１０μｇ／ｍＬのテトラサイクリン及び１ｍＭのＩＰＴＧを含む１．５％　ＬＢ－アガロースの寒天培地上で生育を観察し、増殖抑制を示した菌株をｍａｚＦ誘導発現系がゲノム上に導入されている枯草菌と断定し、これを単離してｍａｚＦ誘導発現系導入枯草菌Ｎｖｃ株と命名した。

【００５６】

（２）Ｎｖｃ株のｍａｚＦ遺伝子挿入位置の同定

Ｎｖｃ株のｍａｚＦ遺伝子挿入位置を同定するため、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓのｖｅｇ遺伝子近傍の塩基配列をもとに配列表の配列番号１５及び１６記載の塩基配列を有するプライマーｖｅｇ１３及びｖｅｇ１４を合成した。さらに、Ｎｖｃ株菌体を鋳型として、プライマーｌａｃ６とｖｅｇ１３、プライマーｔｅｔ１とｖｅｇ１４の２種のプライマー対のそれぞれを組み合わせてＰＣＲを行った。ＰＣＲの反応液調製にはＴａＫａＲａ　ＥｘＴａｑ（タカラバイオ社製）を使用し、反応条件は９８℃　１分反応後、９８℃　１０秒、５５℃　１５秒、７２℃　２．５分を１サイクルとする３０サイクルの反応、とした。

【００５７】

反応終了後、反応液を１％アガロースゲル電気泳動に供し、それぞれ０．８ｋｂｐ、２．５ｋｂｐの大きさのＤＮＡ断片が増幅していることを確認した。当該ＤＮＡ増幅断片は、挿入ＤＮＡ内部プライマーと挿入されたＤＮＡの外側のプライマーによって増幅されたものであり、その大きさも予想していた大きさと一致していたことからｐＮ　ｖｅｇ　ｇｌａｃ－ｃ　ＤＮＡは、枯草菌ゲノム上のｖｅｇプロモーター領域に挿入されていることが確認された。

【００５８】

実施例３　本システムを利用した菌体内蛋白質の分泌発現

（１）ＥｎｖＺＢ発現プラスミドの作製

まず、本システムで用いるための分泌発現用のベースベクターを作製した。即ち、Ｇｅｎｂａｎｋ　Ａｃｃ．ＮＣ＿０００９６４で公開されている枯草菌ａｐｒＥ遺伝子のプロモーター及び分泌シグナルペプチドの塩基配列、並びにｐＣｏｌｄ（登録商標）　ＤＮＡ（タカラバイオ社製）のマルチクローニングサイト、ＨｉｓＴａｇ塩基配列及びターミネーター配列を組み合わせ、さらに分泌シグナルペプチドのアミノ酸配列は保持したまま、ＡＣＡ配列を他の配列に変化させた人工遺伝子を合成した（ジーンアート社が作製）。当該人工遺伝子合成では、ＡｐｒＥの分泌シグナルペプチドをコードする配列が枯草菌での発現に最適なコドンになるように調製した。この人工遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号１７に示す。当該人工遺伝子において、ＡｐｒＥプロモーターは核酸番号７－１７８、ＡｐｒＥシグナルペプチドは核酸番号１９８－２８４、ｐＣｏｌｄ　ＤＮＡのマルチクローニングサイトは核酸番号２９７－３５６、ＨｉｓＴａｇは核酸番号３６０－３７７、ｐＣｏｌｄ　ＤＮＡのターミネーター配列は核酸番号４１１－４４５に対応する。

【００５９】

前述の人工遺伝子を含むプラスミドをＳｐｅＩ（タカラバイオ社製）、ＮｈｅＩ（タカラバイオ社製）で制限酵素消化を行い、４５０ｂｐのＤＮＡ断片を精製した。このＤＮＡ断片をＢ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ　Ｓｅｃｒｅｔｏｒｙ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ＳｙｓｔｅｍのシャトルベクターｐＢＥ－Ｓ　ＤＮＡ（タカラバイオ社製）のＳｐｅＩ、ＸｂａＩサイトに導入した。このプラスミドをベースベクターとして用いた。

【００６０】

次に、大腸菌の菌体内に存在するＥｎｖＺＢ蛋白をコードするｅｎｖＺＢ遺伝子は、ｐＣｏｌｄ　Ｉ　（ＳＰ－４）　ｅｎｖＺＢ　ＤＮＡ（タカラバイオ社製）から、ＮｄｅＩ及びＸｂａＩで切り出し、精製して調製した。当該プラスミド上のｅｎｖＺＢ遺伝子は、既にＡＣＡ配列がないように調製されたものである。このＤＮＡ断片を上記プラスミドの同サイトに導入してＥｎｖＺＢ発現プラスミドを作製した。

【００６１】
（２）Ｎｖｃ株によるＥｎｖＺＢタンパク質の分泌発現
ＥｎｖＺＢの分泌発現について検討した。
まず、上記（１）で調製したＥｎｖＺＢ発現プラスミドを用いて枯草菌Ｎｖｃ株を形質転換した。得られた新鮮な単一コロニーをＢａｃｔｏｔｒｙｐｔｏｎ　１０ｇ／Ｌ、ｙｅａｓｔ　ｅｘｔｒａｃｔ　５ｇ／Ｌ、ＮａＣｌ　５ｇ／Ｌ、カナマイシン１０μｇ／Ｌ、テトラサイクリン　５μｇ／Ｌを組成とする培地（以下ＫＴ－ＬＢ培地と記載する）２ｍＬに懸濁し、２８℃で終夜培養した。翌日、ＫＴ－ＬＢ培地３．８ｍＬに前記終夜培養液０．２ｍＬを加えて培養を開始した。３７℃培養では５時間後、１０時間後、２８時間後、２８℃培養では１０時間後、２８時間後の培養液を回収した。回収した培養液は２３００×ｇ　４分間の遠心分離を行って菌体を沈殿させ培養上清を回収し、さらに回収した培養上清を９１００×ｇ　３分間の遠心分離を行って、培養上清サンプルを調製した。また、上記培養について継時的にＯＤ６６０を測定したところ、ＲＩＫ１２８５株に比較して、Ｎｖｃ株は増殖速度が低下していることが確認され、ＩＰＴＧ非存在下でも若干量のＭａｚＦタンパク質が発現していることが示唆された。回収された培養上清サンプル３０μＬをＳＤＳ－ＰＡＧＥに供し、ＣＢＢで染色して目的のＥｎｖＺＢタンパク質の分泌発現を観察した。その結果を図１に示す。
【００６２】
すなわち図１は、本システムでＥｎｖＺＢタンパク質を分泌発現させた培養上清のＳＤＳ－ＰＡＧＥであり、レーン１はｌｏｗ　ｒａｎｇｅ分子量マーカー（バイオラッド社製）、レーン２はＥｎｖＺＢタンパク質発現プラスミドをＲＩＫ１２８５株に導入して培養した培養上清であり、レーン２は３７℃　１０時間培養の場合を示す。レーン３～７はＥｎｖＺＢタンパク質発現プラスミドをＮｖｃ株に導入して培養した培養上清を示し、レーン３は３７℃　５時間培養の場合、レーン４は３７℃　１０時間培養した場合、レーン５は３７℃　２８時間培養した場合、レーン６は２８℃　１０時間培養した場合、レーン７は２８℃　２８時間培養した場合を示す。
【００６３】
図１に示したように、コントロールとしてＥｎｖＺＢ発現プラスミドをＲＩＫ１２８５株に導入した枯草菌の培養上清では、ＬＢ培地由来の低分子タンパク質を含む夾雑タンパク質のみであり、目的のＥｎｖＺＢタンパク質の分泌は確認できなかった。しかし、Ｎｖｃ株を用いた場合、ＥｎｖＺＢタンパク質のバンドが確認され、その一方で夾雑タンパク質のバンドはＬＢ培地由来の低分子タンパク質を除き確認できなかった。また、培養条件としては３７℃　１０時間培養が最適であり、その時のＥｎｖＺＢタンパク質の生産量はＢＳＡを指標とすると１１μｇ／ｍＬであった。以上のことから、ｍａｚＦ遺伝子導入枯草菌をもちいた目的タンパク質の分泌発現においては、大量のＭａｚＦタンパク質を発現させる必要はないことが確認できた。即ち、増殖を停止させず培養を続けることが単一タンパク質の分泌に有利であることが確認できた。以上のことから本発明の方法は、配列特異的エンドヌクレアーゼを大量に発現させる大腸菌を用いた単一タンパク質生産システムと比較して、宿主の増殖を保持しながら配列特異的エンドヌクレアーゼを発現制御させる点において大きく異なることが確認できた。
【００６４】
実施例４　本システムを用いた菌体外酵素タンパク質の分泌発現
（１）β－ｌａｃｔａｍａｓｅ発現プラスミドの作製
本システムについて、異種菌体外タンパク質をターゲットにして検討した。本実施例では、β－ｌａｃｔａｍａｓｅを選択した。まず、プラスミドｐＵＣ１９に保持されているβ－ｌａｃｔａｍａｓｅ遺伝子のシグナルペプチドに対応する塩基配列を除いた塩基配列中のＡＣＡ配列をアミノ酸変化させないように他の配列に変化させ、さらに枯草菌での発現に適するようにコドンを変換した人工遺伝子を調製した。この人工遺伝子ＤＮＡの塩基配列を配列表の配列番号１８に示す。末端をＮｄｅＩ，ＸｂａＩの突出末端に変換した前記の人工遺伝子（ＤＮＡ断片）を実施例３－（１）で調製したベースベクターのＮｄｅＩ

、ＸｂａＩサイトに導入し、β－ｌａｃｔａｍａｓｅ－ＨｉｓＴａｇ融合タンパク発現プラスミドを作製した。次に、前記プラスミドを制限酵素ＸｂａＩで切断後、末端を平滑化した。こうして得られたＤＮＡ断片をＤＮＡ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ　＜Ｍｉｇｈｔｙ　Ｍｉｘ＞を用いて閉環させることにより、β－ｌａｃｔａｍａｓｅ発現プラスミドを得た。

【００６５】

（２）Ｎｖｃ株培養によるβ－ｌａｃｔａｍａｓｅ分泌発現

上記（１）で調製したβ－ｌａｃｔａｍａｓｅ発現プラスミドを枯草菌Ｎｖｃ株に導入し、カナマイシン耐性コロニーを選択した。新鮮な単一コロニーをＫＴ－ＬＢ培地２ｍＬに懸濁し、２８℃で終夜培養した。翌日、ＫＴ－ＬＢ培地３．８ｍＬにこの終夜培養液を０．２ｍＬ加えて培養を開始した。同時に枯草菌の増殖に影響を与えない低濃度の１μＭ　ＩＰＴＧを加えたＫＴ－ＬＢ培地でも同様の培養を行った。３７℃培養では５時間後、１０時間後、２８時間後に、２８℃培養で１０時間後、２８時間後培養液を回収した。回収した培養液は、２３００×ｇ　４分間の遠心分離を行って菌体を沈殿させ培養上清を回収し、さらに回収した培養上清を９１００×ｇ　３分間の遠心分離を行って、培養上清サンプルを調製した。回収された培養上清３０μＬをＳＤＳ－ＰＡＧＥに供し、ＣＢＢ染色を行って、β－ｌａｃｔａｍａｓｅの分泌発現を確認した。その結果を図２に示す。

【００６６】

すなわち図２は、本システムでβ－ｌａｃｔａｍａｓｅタンパク質を分泌発現させた培養上清のＳＤＳ－ＰＡＧＥであり、レーン１はｌｏｗ　ｒａｎｇｅ分子量マーカー（バイオラッド社製）、レーン２はβ－ｌａｃｔａｍａｓｅタンパク質発現プラスミドをＲＩＫ１２８５株に導入して３７℃　１０時間培養した培養上清、レーン３～１２はβ－ｌａｃｔａｍａｓｅタンパク質発現プラスミドをＮｖｃ株に導入して培養した培養上清を示し、レーン３は３７℃　５時間培養した場合、レーン４は１μＭのＩＰＴＧ添加ＬＢ培地で３７℃　５時間培養した場合、レーン５は３７℃　１０時間培養した場合、レーン６は１μＭのＩＰＴＧ添加ＬＢ培地で３７℃　１０時間培養した場合、レーン７は３７℃　２８時間培養した場合、レーン８は１μＭのＩＰＴＧ添加ＬＢ培地で３７℃　２８時間培養した場合、レーン９は２８℃　１０時間培養した場合、レーン１０は１μＭのＩＰＴＧ添加ＬＢ培地で２８℃　１０時間培養した場合、レーン１１は２８℃　２８時間培養した場合、レーン１２は１μＭのＩＰＴＧ添加ＬＢ培地で２８℃　２８時間培養した場合を示す。

【００６７】

図２に示したように、コントロールとなるβ－ｌａｃｔａｍａｓｅ発現プラスミドをＲＩＫ１２８５株に導入した枯草菌の培養上清でもβ－ｌａｃｔａｍａｓｅタンパク質は分泌していたが、夾雑タンパク質も多数分泌されていた。しかしながら、Ｎｖｃ枯草菌を用いた培養上清では夾雑タンパク質の分泌は顕著に減少しており、１μＭ　ＩＰＴＧを添加することでさらに夾雑タンパク質の混入を減少させることができた。また、培養条件としては、１μＭ　ＩＰＴＧ添加培地で２８℃　２８時間の培養が最適で、その時のβ－ｌａｃｔａｍａｓｅの生産量はＢＳＡを指標にして１９μｇ／ｍＬだった。本実施例においても、ＭａｚＦタンパク質を大量発現させることなく高純度の目的タンパク質を取得することができた。

【００６８】

（３）Ｎｖｃ枯草菌を用いて生産したβ－ｌａｃｔａｍａｓｅの酵素活性

β－ｌａｃｔａｍａｓｅ－ＨｉｓＴａｇ融合タンパク質発現プラスミドを用いて、ＲＩＫ１２８５株及びＮｖｃ株を形質転換し、得られたカナマイシン耐性コロニー４個をそれぞれＫＴ－ＬＢ培地２ｍＬに懸濁し、２８℃で培養した。２８時間培養後、培養液を回収し、２３００×ｇ　４分間の遠心分離を行って菌体を沈殿させ培養上清を回収し、さらに回収した培養上清を９１００×ｇ　３分間の遠心分離を行って、培養上清サンプルを調製した。回収した培養上清４００μＬについて、ＵＬＴＲＡＦＲＥＥ－ＭＣ　１００００ＮＭＷＬ　Ｆｉｌｔｅｒ　ｕｎｉｔ（ミリポア社製）を用いて１０倍濃縮した後にリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で１０倍希釈する操作を３回繰り返して、培地由来の低分子タン

パク質を除いた。さらにこの試料を４０μＬに濃縮して酵素活性測定を行った。また、β－ｌａｃｔａｍａｓｅの酵素活性は、バイオケミカル ジャーナル（Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｊ．）、第１３９巻、第７８９～７９０頁（１９７４）記載の方法に基づき、アンピシリンのＡ２３５ｎｍの減少を指標に測定した。その結果を図３に示す。

【００６９】

すなわち図３は、本システムで分泌発現させたβ－ｌａｃｔａｍａｓｅタンパク質の酵素活性を示したグラフであり、縦軸は、酵素活性（Ｕ／μＬ）、横軸は、使用した宿主名を示す。

【００７０】

図３に示したようにＲＩＫ１２８５株を用いたβ－ｌａｃｔａｍａｓｅ生産の培養上清は平均で０．３４Ｕ／μＬ、Ｎｖｃ株の培養上清は平均で７．２Ｕ／μＬの酵素活性を示した。またバイオラッド ｐｒｏｔｅｉｎ ａｓｓａｙ（バイオラッド社製）を用いて各培養上清の総タンパク量を測定し、酵素活性と総タンパク量から比活性を計算した。その結果、ＲＩＫ１２８５株を用いた培養上清のβ－ｌａｃｔａｍａｓｅの比活性は２．４Ｕ／ｍｇであった。一方、Ｎｖｃ株の培養上清の比活性は６１Ｕ／ｍｇであった。このことからＮｖｃ株を用いて生産されたβ－ｌａｃｔａｍａｓｅは、コントロールとなるＲＩＫ１２８５株に対して酵素活性で２１倍、比活性で２５倍という高い値を示した。

【００７１】

（４）本システムで調製したタンパク質の純度の検討

上記実施例４－（３）で得られた結果をもとに本システムで調製したタンパク質の純度について検討した。まず、β－ｌａｃｔａｍａｓｅ－ＨｉｓＴａｇ融合タンパク質発現プラスミドを保持するＲＩＫ１２８５株の新鮮なコロニーをＫＴ－ＬＢ培地２０ｍＬに懸濁し、２８℃ ３０時間培養した。培養液を１２００×ｇ １０分間の遠心分離を行って菌体を沈殿させ培養上清を回収し、さらに回収した培養上清を７３００×ｇ ３０分間の遠心分離を行って、培養上清サンプルを調製した。この培養上清に２００μＬのＮｉ－ＮＴＡ アガロース（キアゲン社製）を加えて、４℃ ２時間緩やかに振とうした。次に、β－ｌａｃｔａｍａｓｅ－ＨｉｓＴａｇと結合させたＮｉ－ＮＴＡアガロースをＥｃｏｎｏ－Ｐａｃ Ｄｉｓｐｏｓａｂｌｅ Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ Ｃｏｌｕｍｎ（バイオラッド社製）に充填し、このカラムをｗａｓｈ ｂｕｆｆｅｒ（５０ｍＭ Ｓｏｄｉｕｍ ｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｂｕｆｆｅｒ ｐＨ８．０、０．３Ｍ ＮａＣｌ）１ｍＬで３回洗浄した。その後、ｅｌｕｔｅ ｂｕｆｆｅｒ（５０ｍＭ Ｓｏｄｉｕｍ ｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｂｕｆｆｅｒ ｐＨ８．０、０．３Ｍ ＮａＣｌ、３００ｍＭ Ｉｍｉｄａｚｏｌｅ）５００μＬでβ－ｌａｃｔａｍａｓｅ－ＨｉｓＴａｇタンパク質を溶出させた。カラムより溶出されたβ－ｌａｃｔａｍａｓｅ－ＨｉｓＴａｇタンパク質溶液は１ＬのＰＢＳに対して３回透析して精製β－ｌａｃｔａｍａｓｅ－ＨｉｓＴａｇタンパク質溶液を得た。このタンパク質溶液中のβ－ｌａｃｔａｍａｓｅ活性、及び総タンパク質を上記実施例４－（３）と同様の方法で定量した。

【００７２】

同様にＮｖｃ株を利用してβ－ｌａｃｔａｍａｓｅ－ＨｉｓＴａｇタンパク質の生産を行った。即ち、β－ｌａｃｔａｍａｓｅ－ＨｉｓＴａｇ融合タンパク質発現プラスミドを保持するＮｖｃ株の新鮮なコロニーを１０μｇ／ｍＬ濃度のカナマイシン及び５μｇ／ｍＬ濃度のテトラサイクリンを含むＬＢ培地２０ｍＬに懸濁し、２８℃ ３０時間培養した。培養液を１２００×ｇ １０分間の遠心分離を行って菌体を沈殿させ培養上清を回収し、さらに回収した培養上清を７３００×ｇ ３０分間の遠心分離を行って、培養上清サンプルを調製した。培養上清は、Ｃｅｎｔｒｉｐｒｅｐ Ｕｌｔｒａｃｅｌ ＹＭ－１０（ミリポア社製）を用いて２ｍＬまで濃縮した。このうち４００μＬをＵＬＴＲＡＦＲＥＥ－ＭＣ １００００ＮＭＷＬ Ｆｉｌｔｅｒ ｕｎｉｔを用いて１０倍濃縮した後にＰＢＳで１０倍希釈する操作を３回繰り返し、培地由来の低分子タンパク質を取り除いた。最終サンプルを４００μＬとし、１ＬのＰＢＳに対して３回透析してβ－ｌａｃｔａｍａｓｅ－ＨｉｓＴａｇタンパク質溶液を得た。このタンパク質溶液中のβ－ｌａｃｔａｍａｓ

ｅ活性、及び総タンパク質を上記実施例４－（３）と同様の方法で定量した。前記比活性について図４に示す。

【００７３】

すなわち図４は、本システムで分泌発現させた菌体外酵素の比活性を示すグラフであり、縦軸は酵素比活性（Ｕ／ｍｇ）、横軸は試料の種類を示す。

【００７４】

図４に示したように本発明のシステムで得られる培養上清を限外濾過／希釈／透析して調製した試料におけるβ－ｌａｃｔａｍａｓｅ－ＨｉｓＴａｇタンパク質の比活性は、９１Ｕ／ｍｇであった。一方、ＲＩＫ１２８５株を宿主として得られた培養上清よりＮｉアフィニティカラムにより精製されたβ－ｌａｃｔａｍａｓｅ－ＨｉｓＴａｇタンパク質の比活性は、９７Ｕ／ｍｇであった。即ち、両者は非常に近い値であることから、枯草菌Ｎｖｃ株を用いてタンパク質を分泌させた培養上清について濃縮や透析を行うことだけで、カラム精製タンパク質溶液とほぼ同純度のタンパク質溶液が得られることが確認できた。従って、本システムを用いれば、純度の高い目的のタンパク質をほとんど精製操作することなく取得することができることが確認できた。

【００７５】

実施例５　本システムを用いたヒト由来サイトカインの分泌発現

（１）ヒトインターフェロンα２ｂタンパク発現プラスミドの作製

本システムについて、ヒト由来菌体サイトカインをターゲットにして検討した。本実施例では、インターフェロンα２ｂを選択した。まず、Ｇｅｎｂａｎｋ　Ａｃｃ．ＡＹ２５５８３８．１で公開されているヒト由来インターフェロンα２ｂ（以下、ヒトインターフェロンα２ｂと記載する）遺伝子の塩基配列を元に配列中のＡＣＡ配列をコードされるアミノ酸を変化させないように他の配列に変化させ、さらに枯草菌での発現に適するようにコドンを変換した人工遺伝子を調製した。またこの人工遺伝子の５′端にはＮｄｅＩの、３′端にはｐＣｏｌｄのマルチクローニングサイト（ＸｈｏＩ，　ＢａｍＨＩ，　ＥｃｏＲＩ，　ＨｉｎｄＩＩＩ，　ＳａｌＩ，　ＰｓｔＩ，　ＸｂａＩ）が付加してある。この人工遺伝子ＤＮＡの塩基配列を配列表の配列番号１９に示す。末端をＮｄｅＩ，ＸｂａＩの突出末端に変換した前記の人工遺伝子（ＤＮＡ断片）を実施例３－（１）で調製したベースベクターのＮｄｅＩ、ＸｂａＩサイトに導入し、ヒトインターフェロンα２ｂタンパク発現プラスミドを作製した。

【００７６】

（２）Ｎｖｃ株培養によるヒトインターフェロンα２ｂ分泌発現

実施例５－（１）で作製したヒトインターフェロンα２ｂ発現プラスミドを枯草菌Ｎｖｃ株に導入し、カナマイシン耐性コロニーを選択した。新鮮な単一コロニーをＢａｃｔｏｔｒｙｐｔｏｎ　１０ｇ／Ｌ、ｙｅａｓｔ　ｅｘｔｒａｃｔ　５ｇ／Ｌ、ＮａＣｌ　２．５ｇ／Ｌ、カナマイシン１０μｇ／Ｌ、テトラサイクリン　５μｇ／Ｌを組成とする培地（以下ＫＴ－ＬＢ０．２５培地と記載する）２ｍＬに懸濁し、２５℃で２日培養した。培養液は、２３００×ｇ　４分間の遠心分離を行って菌体を沈殿させ培養上清を回収し、さらに回収した培養上清を９１００×ｇ　３分間の遠心分離を行って、培養上清サンプルを調製した。回収された培養上清３０μＬをＳＤＳ－ＰＡＧＥに供し、ＣＢＢ染色を行って、ヒトインターフェロンα２ｂの分泌発現を確認したが発現量は極めて少なかった。

【００７７】

（３）ヒトインターフェロンα２ｂ分泌発現プラスミドへの１７３種シグナルペプチドの挿入

実施例５－（１）で作製したヒトインターフェロンα２ｂ発現プラスミドを制限酵素ＭｌｕＩ、　Ｅｃｏ５２Ｉで切断し、約６．７ｋｂｐのＤＮＡ断片を調製した。また、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ　Ｓｅｃｒｅｔｏｒｙ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ（タカラバイオ社製）中の１７３種類の分泌シグナルペプチドＤＮＡ混合物であるＳＰ　ＤＮＡ　ｍｉｘｔｕｒｅを同様に制限酵素ＭｌｕＩ、　Ｅｃｏ５２Ｉで切断し、エタノール沈殿で精製した。切断されたヒトインターフェロンα２ｂ分泌発現プラスミ

ド０．５μｇと切断したＳＰ　ＤＮＡ　ｍｉｘｔｕｒｅ　１．２ｐｍｏｌを混合し、ＤＮＡ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ　＜Ｍｉｇｈｔｙ　Ｍｉｘ＞（タカラバイオ社製）を用いて１６℃で３０分間ライゲーションした。ライゲーション溶液を用いて大腸菌ＨＳＴ０８を形質転換し、アンピシリン耐性コロニーを選択した。１００００個以上のコロニーをかきとり、プラスミドを調製して、１７３種類のシグナルペプチドをコードする配列のいずれかが挿入されたヒトインターフェロンα２ｂ分泌発現プラスミドの混合物を得た。

【００７８】

（４）ヒトインターフェロンα２ｂ高分泌発現枯草菌のスクリーニング

実施例５－（３）で調製したヒトインターフェロンα２ｂ分泌発現プラスミドの混合物１０μｇを用いて枯草菌ＲＩＫ１２８５株を形質転換し、カナマイシン耐性コロニーを選択した。これらコロニー上にニトロセルロース膜（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を上層して３７℃　３時間培養して分泌タンパクをニトロセルロース膜に転写した。この膜上のインターフェロンａ２ｂタンパク質をａｎｔｉ－ＩＦＮα抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社）を用いて定法により検出し、強いシグナルを与えたコロニーを分離した。これらのコロニーを培養してプラスミドを調製し塩基配列解析を行い、挿入されたシグナルペプチドをｌｉｐＡ遺伝子由来のシグナルペプチドと同定した。

【００７９】

（５）ｌｉｐＡシグナルペプチドのＡＣＡ配列除去と再クローニング

ｌｉｐＡの塩基配列を元にＡＣＡ配列を、アミノ酸を変化させないように他の配列に変化させたシグナルペプチドをコードする配列の５′、３′末端に、それぞれ実施例３－（１）で調製したベースベクターのＭｌｕＩサイトの上流１５ｂｐの塩基配列、Ｅｃｏ５２Ｉサイトの下流１５ｂｐの塩基配列を付けた人工遺伝子を合成した。この人工合成遺伝子の塩基配列を配列番号２０に示す。この人工遺伝子を実施例５－（３）で作製したＭｌｕＩ、Ｅｃｏ５２Ｉ切断ヒトインターフェロンα２ｂ分泌発現プラスミドと混合し、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（商標）　Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ（タカラバイオ社製）で連結した。この反応液で大腸菌ＪＭ１０９を形質転換し、得られたアンピシリン耐性コロニーからプラミドを調製してｌｉｐＡ挿入ヒトインターフェロンα２ｂ分泌発現プラスミドを作製した。

【００８０】

（６）ｌｉｐＡシグナルペプチドを用いたヒトインターフェロンα２ｂの選択的分泌発現

実施例５－（５）で得られたｌｉｐＡ挿入ヒトインターフェロンα２ｂ分泌発現プラスミドを用いて枯草菌Ｎｖｃ株を形質転換しカナマイシン耐性コロニーを選択した。新鮮な単一コロニーをＫＴ－ＬＢ０．２５培地２ｍＬに懸濁し、２５℃で２日培養した。培養液は、２３００×ｇ　４分間の遠心分離を行って菌体を沈殿させ培養上清を回収し、さらに回収した培養上清を９１００×ｇ　３分間の遠心分離を行って、培養上清サンプルを調製した。この培養上清をＳＤＳ－ＰＡＧＥで解析したところ、単一バンドとしてインターフェロンα２ｂが観察された。このように本発明のシステムと適当なシグナルペプチドの選択とを組み合わせることで、通常では分泌発現困難なインターフェロンα２ｂなどのサイトカインでも高純度に生産することが可能になった。

【産業上の利用可能性】

【００８１】

本発明を用いることにより、純度の高い目的のタンパク質をほとんど精製操作することなく取得することができる。

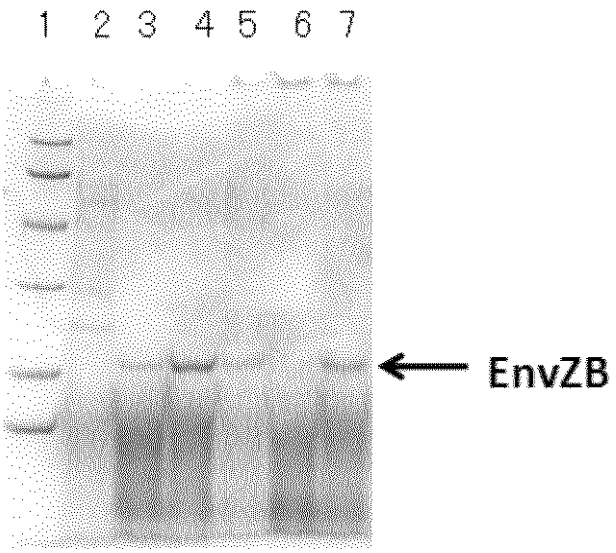
【配列表フリーテキスト】

【００８２】

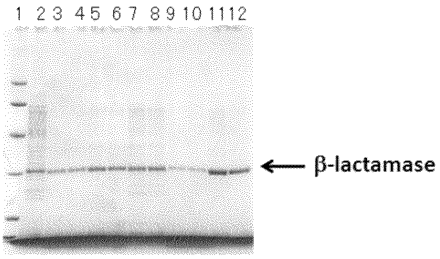
SEQ ID NO:1: Primer tet1 to amplify the tet gene
SEQ ID NO:2: Primer tet2 to amplify the tet gene
SEQ ID NO:3: Synthetic DNA encoding the tet gene
SEQ ID NO:4: Primer veg3 to amplify the veg promoter
SEQ ID NO:5: Primer veg/lac4 to amplify the veg promoter and the lacI gene

SEQ ID NO:6: Primer lac5 to amplify the lacI gene
SEQ ID NO:7: Primer lac6 to amplify the lacI gene
SEQ ID NO:8: Primer glac7 to amplify the glac-c promoter
SEQ ID NO:9: Primer glac8 to amplify the glac-c promoter
SEQ ID NO:10: Primer glac9 to amplify the glac-c promoter
SEQ ID NO:11: Primer glac10 to amplify the glac-c promoter
SEQ ID NO:12: Primer glac11 to amplify the glac-c promoter
SEQ ID NO:13: Primer glac12 to amplify the glac-c promoter
SEQ ID NO:14: Synthetic DNA encoding the glac-c promoter
SEQ ID NO:15: Primer veg13 for PCR
SEQ ID NO:16: Primer veg14 for PCR
SEQ ID NO:17: Synthetic DNA encoding the AprE signal peptide, multicloning site and pCOLD terminator
SEQ ID NO:18: Synthetic DNA encoding the beta-lactamase
SEQ ID NO:19: Synthetic DNA encoding the modified human interferon a2b
SEQ ID NO:20: Synthetic DNA encoding the modified lipA signal peptide

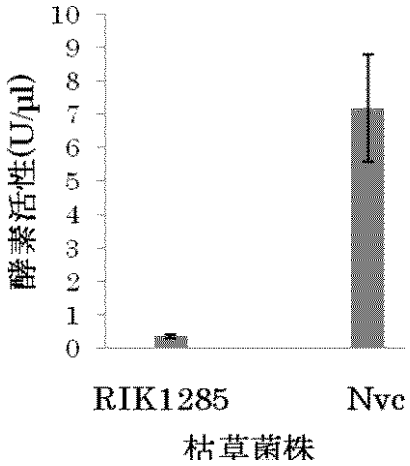
【図１】



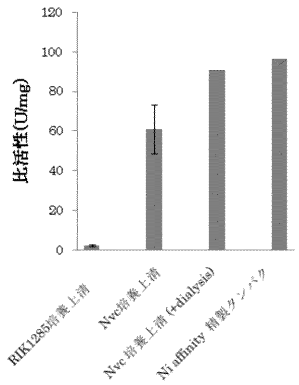
【図２】



【図３】



【図４】



【配列表】
2011217730000001.app

フロントページの続き

(72)発明者　浅田　起代蔵
滋賀県大津市瀬田三丁目４番１号　タカラバイオ株式会社内

Ｆターム(参考) 4B024 AA20 CA01 CA09 CA11 CA20 DA01 DA02 DA05 DA11 DA12
FA02 GA11 HA01 HA11
4B064 AG01 CA02 CA05 CA06 CA10 CA19 CC24